



代謝活性中間体と蛋白付加体生成

著者	後藤 順一
雑誌名	東北医学雑誌
巻	114
号	2
ページ	199-204
発行年	2002-12
URL	http://hdl.handle.net/10097/51291

代謝活性中間体と蛋白付加体生成

The Metabolic Active Intermediates and Protein-Bound Adduct

後 藤 順 一

東北大学医学部附属病院薬剤部

1. はじめに

内因性生理活性物質や投与された薬物は、生体内で代謝を受け、様々な形に変換される。水酸化、酸化等は第一相代謝反応、またグルクロン酸抱合や硫酸抱合は第二相代謝反応と呼ばれる。2-アрилプロピオン酸系抗炎症薬に代表されるカルボキシル基を有する薬物は、第二相代謝反応としてアミノ酸抱合を受けるが、この時 Coenzyme A (CoA) チオエステル体が中間体となる。CoA チオエステルは生体内キラル異性化反応とも深く関係しており、また脂肪酸の生合成や β 酸化にも重要な役割を果たしている。近年、この CoA チオエステルの生成に先立って AMP との縮合体であり、より活性なアシルアデニレートが中間体として生成することが指摘されている。一方、生体内においてカルボキシル基がグルクロン酸と抱合したエステル型のアシルグルクロニドへと変換されることが注目されている。こうしたアシルグルクロニド、アシルアデニレートは、水溶性に富むばかりか、それ自身反応性が高く、生体内タンパク質の遊離アミノ基と容易に縮合し、付加体を形成することも予想され、生成した付加体が抗原性を獲得する危険性も指摘されている。そこで今回、生体内カルボン酸誘導体の例として胆汁酸を取り上げ、アシルグルクロン酸抱合、アシルアデニレートの生成、並びに蛋白質共有結合付加体生成について精査した。

2. 胆汁酸

胆汁酸は、炭素数 24 個のカルボン酸であり、ヒトにおいては Fig. 1 に示す 5 種が主なものとして知られている。コール酸 (CA) 及びケノデオキシコール酸 (CDCA) は 1 次胆汁酸と呼ばれ、デオキシコール酸 (DCA)、リトコール酸 (LCA) 並びにウルソデオキシコール酸 (UDCA) は 2 次胆汁酸と呼ばれる。胆汁酸の生合成は、コレステロールの 7α 位水酸化酵素の転写を抑制するネガティブフィードバック機構によって調節されており、また小腸での胆汁酸の取り込みを促進する輸送蛋白質の発現を誘導することにより、自身の再吸収も調節している。胆汁酸はこのように腸肝という閉鎖的な系内に局在し、かつ調節を受けているため、通常血中、尿中には極わずかにしか存在しない。しかし、胆汁うっ滞などの肝胆道疾患時には、血中並びに尿中排泄量が増大するばかりか、ステロイド核上水酸基を介した種々の抱合体へと変換される。すなわち、3 位の硫酸抱合体や、原発性胆汁性肝硬変における 7β 位の *N*-アセチルグルコサミン抱合等が知られている。また、疎水性化合物の排泄機構として知られているグルクロン酸抱合も明らかにされており、これら胆汁酸抱合体と、各種肝胆道疾患との関連に注目が寄せられている。

3. 胆汁酸のアシルグルクロン酸抱合

従来、胆汁酸グルクロニドの構造は、ステロイド核

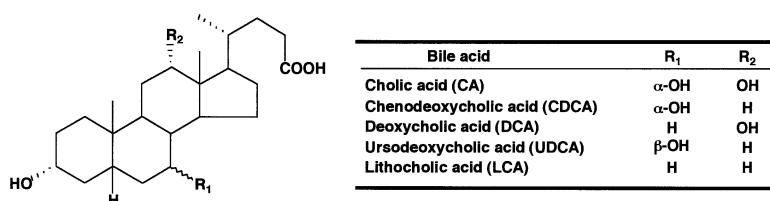


Fig. 1 Structures of Bile Acids

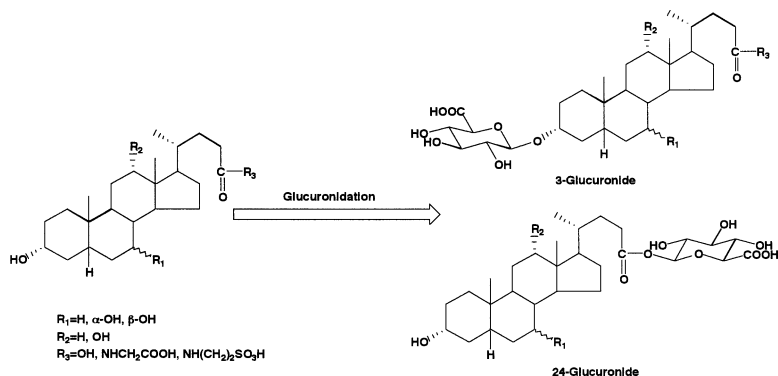


Fig. 2 Glucuronidation of Bile Acids

上3位水酸基を介するエーテル型グルクロニドとされていた。最近筆者らは、ラット肝ミクロソーム画分を用いて胆汁酸のグルクロン酸抱合に検討を加え、24位カルボキシル基を介するエステル型グルクロニド(BA 24-G)の生成が主であることを明らかにした¹⁾。そこで、BA 24-Gと各種疾患との関連を明らかにするため、水溶性極性化合物の高感度測定に優れる液体クロマトグラフィー(LC)/エレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)を用いるBA 24-Gの高感度定量法を確立するとともに、ラット肝ミクロソーム画分を用いる胆汁酸アシルグルクロニルトランスフェラーゼの特性解析に着手した。

まず、内標準物質(IS)として3,7- ^{18}O - ^2H]-CDCA 24-Gを用い、ヒト尿中BA 24-Gの一斉定量を試みた結果、肝ミクロソーム画分によるグルクロン酸抱合は24位カルボキシル基への活性が主であるにもかかわらず、健康人尿中のBA 24-G量は、3位エーテル型グルクロニドのそれと大差ないこと、またそれらは肝胆疾患時にもそれほど大きく変動しないことが判明し

た^{2,3)}。

次に、LC/ESI-MSによる高感度定量法を用いて、ラット肝ミクロソーム画分による胆汁酸アシルグルクロン酸転移活性の特性解析を行った。まず、5種の胆汁酸を基質とし、グルクロン酸転移反応の経時的変化を追跡した。その結果、モノヒドロキシ体>ジヒドロキシ体>トリヒドロキシ体の順で変換されやすく、胆汁酸のステロイド核上水酸基の数並びに立体配位が、グルクロニド生成に大きく影響することが判明した。次いで、アシルグルクロン酸転移速度に与える基質濃度の影響を調べたところ、特にLCAを基質として用いたとき、基質濃度の増大に伴って明らかにアシルグルクロン酸転移速度が減少し、強い基質阻害が認められた。次いで、生体内の胆汁酸のほとんどが24位カルボキシル基にグリシンあるいはタウリン抱合を受けていることから、基質類縁物質であるこれらの化合物のグルクロン酸転移活性に与える影響について検討を加えた。その結果、CDCAを基質とし、そのグリシン並びにタウリン抱合体を阻害物質として用いたとき、阻害

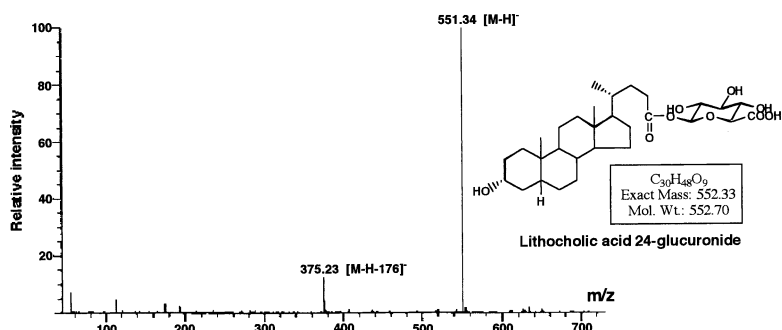


Fig. 3 Electrospray Ionization Mass Spectrum of Lithocholic Acid 24-Glucuronide

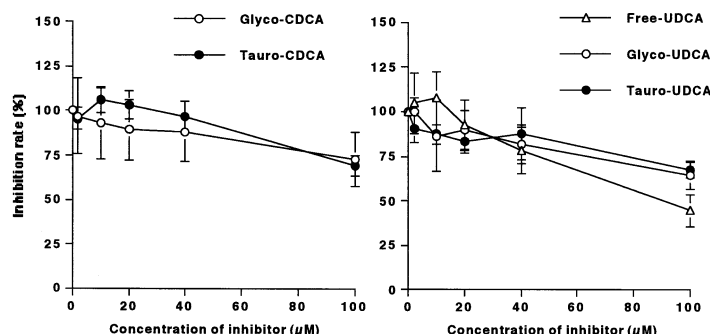


Fig. 4 The Dose Response of the Inhibitory Effect of Conjugated Bile Acids on the Formation of CDCA 24- Glucuronide.

剤の増加に伴って CDCA の 24-G への変換率が低下し, 5 倍モル量の阻害剤の存在は, CDCA のアシルグルクロン酸変換活性を約 25% 阻害することが判明した。同様にジヒドロキシ体であり, 古くから肝胆道疾患治療薬として用いられている UDCA を用いた場合も, グリシン, タウリン抱合体による阻害が約 25% 程度認められた。引き続き, ミクロソーム画分蛋白量とグルクロン酸転移速度の関係を精査したところ, 蛋白量の増大に伴って生成速度の低下が認められ, 生成物阻害の可能性が示唆された。そこで, CA 24-G, UDCA 24-G 並びに LCA 24-G を阻害剤として, CDCA のグルクロン酸転移速度に与える影響について検討した。その結果, LCA 24-G を阻害剤として用いたとき, CDCA 24-G の生成は用量依存的に阻害され, 5 倍モル量の阻害剤の存在下では約 75% 阻害されることが判明した。また, UDCA 24-G を用いた場合は, 先のアミノ酸抱合体と同程度の阻害が認められ, 基質類縁物質である胆汁酸のグリシン・タウリン抱合体によるアシルグルクロン酸変換活性の阻害の事実を考え合わせると, これらの阻害作用がヒト生体内における胆汁酸アシルグルクロニド存在量を調節していることが示唆された。

4. 胆汁酸アデニレート生成

生体内において胆汁酸のほとんどは 24 位カルボキシル基がグリシンあるいはタウリンにより抱合されている。これらアミノ酸抱合は, 胆汁酸 CoA チオエステルを基質とするアミノ酸 *N*-アセチルトランスフェラーゼにより行われる。一方, 脂肪酸や 2-アシルプロピオン酸系抗炎症薬など分子内にカルボキシル基を有する化合物は, CoA チオエステル生成酵素的作用により, AMP との混合酸無水物であるアシルアデニレートへと誘導された後, CoA チオエステルに変換さ

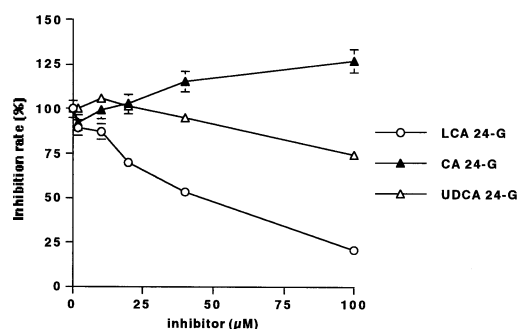


Fig. 5 The Dose Response of the Inhibitory Effect of Bile Acid 24-Glucuronides on the Formation of CDCA 24-Glucuronide.

れると考えられている。胆汁酸においても同様にアデニレート中間体を経ることが示唆されているが, 標品が得難く, また酵素反応によって生成する微量のアデニレート中間体を定量することは極めて困難な課題である。最近筆者らは, 胆汁酸アデニレート並びに胆汁酸 CoA チオエステルの合成に成功し, ESI-MS を用いることにより両者を高感度に測定できることを明らかにした。そこで今回, ラット肝ミクロソーム画分を用いて, CA の CA-AMP への変換並びに CA-CoA への変換に検討を加えた。

コール酸カリウム塩をトリス-塩酸緩衝液中, ATP, Mg^{2+} 及び CoA 存在または非存在下ラット肝ミクロソーム画分と 37°C でインキュベートし, 生成物を LC/ESI-MS を用いて精査した。その結果, CoA 非存在下では CA-AMP 標品と同一の保持値を示すピークが得られ, 一方 CoA 存在下では CA-AMP のピークとともに CA-CoA のピークが認められた。以上の結果から, コール酸がラット肝ミクロソーム画分によりアデニレートに変換されることが実証された。次に,

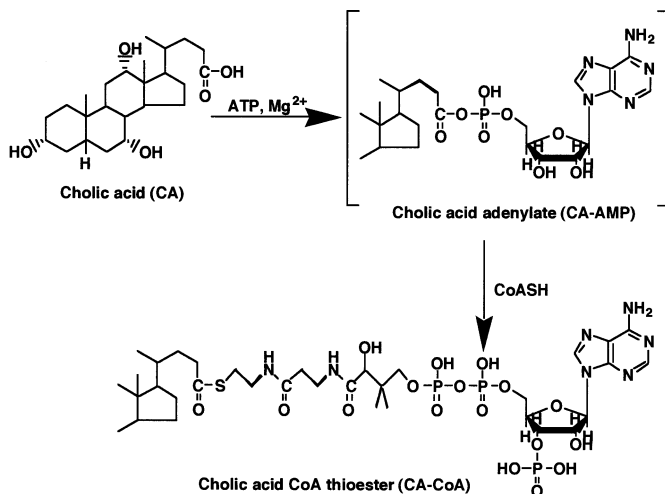


Fig. 6 Structures of Enzymatic Products by Cholic Acid CoA Thioester Ligase

CA-AMP をトリス-塩酸緩衝液中タウリンと 37°C でインキュベートしたところ、タウロコール酸に対応するピークが認められ、CA-AMP が非酵素的にアミノ基と反応し、アミノ酸抱合型胆汁酸を形成することが判明した⁴⁾。

5. 胆汁酸-蛋白質付加体の生成

生体内カルボン酸のアシルグルクロニドやアシルアデニレートなどの活性エステルは、アミノ基や水酸基と容易に反応する。したがって、蛋白質を構成するアミノ酸残基のうち、リジンやアルギニンなどの塩基性側鎖を有するアミノ酸残基が蛋白質分子表面に存在すると、これらカルボン酸の活性体と容易に反応して、安定な蛋白質-低分子共有結合付加体を形成することが予想される。そこでまず、LCA 24-G を例に取り上げ、生体内アミンとの反応性に検討を加えた。

生体内アミンのモデルとして、dynorphin A (RRIR-PKWKWDNQ) を用い、リン酸緩衝液中でモル比 1:20 でインキュベートし、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-TOFMS) により付加体生成を追跡した。その結果、 m/z 1969.9 並びに 2145.7 に付加体と思われるシグナルが出現した。それぞれのシグナルに対応するペプチド断片を HPLC を用いて分取し、ポストソースディケイ (PSD) 分析に付したところ、 m/z 1969.9 のペプチドは N 末端のアルギニン残基に LCA が 1 分子結合したペプチドあるいは 8 番目のリジン残基側鎖に LCA が 1 分子結合したペプチドであることが推測され、さらに m/z 2145.

7 のペプチドは LCA が糖を介してペプチドと結合した付加体と分子量が一致した。同様に、モデル蛋白質としてリゾチームを用いて LCA 24-G とインキュベートし、MALDI-TOFMS による PSD 分析に付したところ、N 末端リジンまたは 97 番目のリジンに LCA がそのままあるいは糖を介して結合していることが判明した⁵⁾。

一方近年、大腸の細胞内核ヒストンに胆汁酸の結合した付加体の存在することが指摘され、大腸ガン発症における 2 次胆汁酸のプロモーター作用との関連から注目されている。そこで次に、胆汁酸アデニレートの極めて高い化学反応性に着目し、アシルアデニレートが核ヒストンとの付加体形成の鍵化合物であるという仮説を立てた。

まず、モデルペプチドとしてサブスタンス P (SP: RPKPQQFFGLM) を取り上げ、DCA-AMP とリン酸緩衝液中モル比 1:1 で 37°C でインキュベートし、生成物を MALDI-TOFMS により追跡した。その結果、時間の経過とともに m/z 1723 及び 2097 にプロトン付加分子 $[M+H]^+$ が出現し、SP との質量差から、それぞれ DCA が 1 分子あるいは 2 分子付加したペプチドであると推察された。次に、各 DCA-ペプチド付加体につき、LC/ESI-MS/MS を用いて構造解析を試みた。その結果、Fig. 8(B) に示す Adduct A は N 末端アミノ基に DCA1 分子が付加したペプチドであり、Adduct B は 3 番目のリジン残基側鎖のアミノ基に DCA1 分子が結合したものであることが、また Adduct C はその両方にそれぞれ DCA が 1 分子ずつ結合した 2 分子付加体であることが判明した。

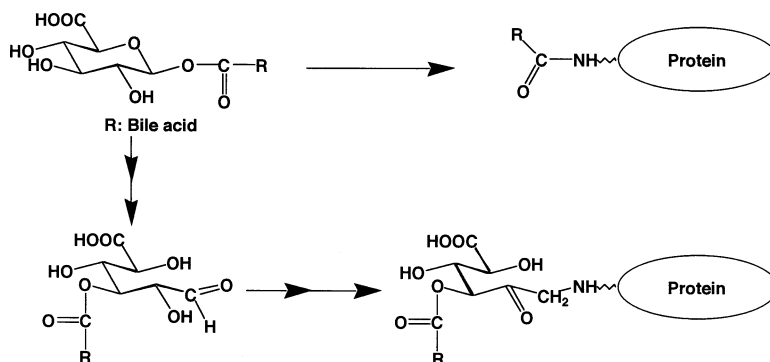


Fig. 7 Proposed Mechanism for the Covalent Binding of Bile Acid Acyl Glucuronides with Protein

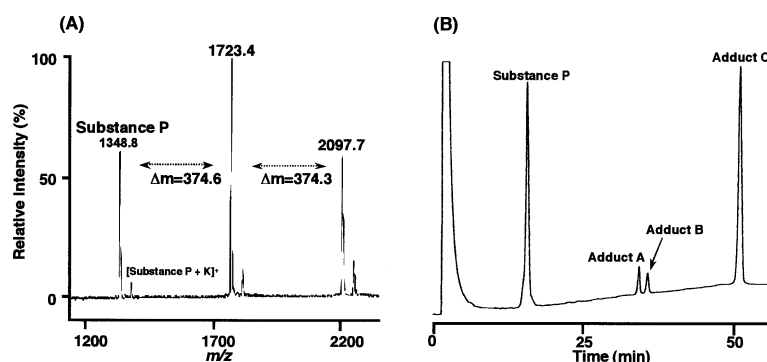


Fig. 8 MALDI Mass Spectrum (A) and HPLC Chromatogram (B) of The Reaction Mixture Resulting from Incubation of Deoxycholyl Adenylate with Substance P.

引き続き、リゾチームをモデル蛋白質としてリン酸緩衝液中CA-AMPとモル比1:10で37℃でインキュベートし、MALDI-TOFMS分析に付した。その結果、リゾチームとの質量差からCAが2分子及び3分子付加したと推測されるプロトン付加分子が認められた。得られたCA-リゾチーム共有結合付加体を還元後カルボキシメチル化し、リシルエンドペプチダーゼを用いてペプチドに断片化した。ペプチド混合物をMALDI-TOFMSを用いてマスマッピングに付し、修飾位置の構造解析を試みた。その結果、N末端リジン残基、33番目、97番目または116番目のリジン残基側鎖のアミノ基に1分子あるいは2分子のCAが結合していることが推定された。これらの事実は、リゾチームの分子表面に露出したリジン残基側鎖のアミノ基が、優先的にCA-AMPと反応したことを示唆している⁶⁾。

6. おわりに

以上今回、生体内カルボン酸の各種代謝に伴う代謝活性中間体の出現と、それに付随する低分子-蛋白質共有結合付加体形成の可能性について述べた。これらは先にも述べたように、低分子ハプテンとキャリアー蛋白質の結合した感作免疫源と同様の構造を有することから、生体内において抗原性を示すことが容易に予想される。さらに、 α -アシルプロピオン酸系抗炎症薬において、アシルグルクロニドの増大が毒性を誘起すること、並びにアシルグルクロン酸転移酵素の阻害剤がその毒性を軽減することが報告されており、これら代謝活性中間体との関連から興味深い。

文 献

- 1) J. Goto, N. Murao, C. Nakada, T. Motoyama, J. Ohashi, T. Yanagihara, T. Niwa and S. Ikegawa (1998) Separation and characterization

- of carboxyl-linked glucuronides of bile acids in incubation mixture of rat liver microsomes. *Steroids*, **63**, 186-192.
- 2) S. Ikegawa, H. Okuyama, J. Oohashi, N. Murao and J. Goto (1999) Separation and detection of bile acid 24-glucuronides in human urine by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Sci.*, **15**, 625-631.
 - 3) S. Ikegawa, N. Murao, T. Motoyama, T. Yanagihara, T. Niwa and J. Goto (1996) Separation and detection of bile acid 3-glucuronides in human urine by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, **10**, 313-317.
 - 4) S. Ikegawa, H. Ishikawa, H. Oiwa, M. Nagata, J. Goto, T. Kozaki, M. Gotowda and N. Asakawa (1999) Characterization of cholyl-adenylate in rat liver microsomes by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **266**, 125-132.
 - 5) S. Ikegawa, N. Murao, M. Nagata, S. Ohba and J. Goto (1999) Covalent binding of bile acid acyl glucuronide with protein. *Anal. Sci.*, **15**, 213-215.
 - 6) J. Goto, M. Nagata, N. Mano, N. Kobayashi, S. Ikegawa and R. Kiyonami (2001) Bile acid acyl adenylate: a possible intermediate to produce a protein-bound bile acid. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 104-109.